

С. А. НЕЙФАХ, М. П. МЕЛЬНИКОВА и Ф. В. МОЖАЙКО

## ПОЛУЧЕНИЕ 6-ФОСФОФРУКТОКИНАЗЫ В ВЫСОКООЧИЩЕННОМ ВИДЕ

(Представлено академиком А. И. Опариным 15 V 1953)

На протяжении последних 16 лет в животных и растительных тканях открыт целый ряд ферментов, гексокиназ, катализирующих перенос фосфатных групп с аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) на свободную или фосфорилированную гексозу. Однако до сих пор из животных тканей ни один из ферментов этой группы не был получен в высокоочищенном виде. Между тем, изучение их химической природы представило бы значительный интерес. Специальный интерес к исследованию 6-фосфофруктокиназы был привлечен работой В. А. Энгельгардта и Н. Е. Сакова (1), показавших, что этот фермент обладает высокой чувствительностью к действию энзиматических систем клеточного дыхания и что изучение этого фермента позволило бы приблизиться к пониманию элементарных форм связи процессов брожения и дыхания. Под действием этого фермента из равновесной смеси глюкозо- и фруктозо-6-фосфатов (Гл-6Ф и Фр-6Ф) и АТФ образуются фруктозодифосфат (Фр-1, 6Ф) и аденозиндифосфорная кислота (АДФ) (2). До сих пор не удавалось получить прямого доказательства непосредственного участия в реакции Фр-6Ф, а не Гл-6Ф, так как ферментный препарат, которым располагали авторы, всегда содержал примесь фосфогексоизомеразы, катализирующей изомеризацию гексозофосфорных эфиров. Отделение 6-фосфофруктокиназы от аденозинтрифосфатазы впервые осуществил Н. Е. Саков (3), однако дальнейшее изолирование киназы им не производилось. Впоследствии аналогичные попытки предпринимались и другими авторами, но в их сообщениях (4-6) содержались только отрывочные сведения о незаконченных исследованиях. Поэтому нам представлялось необходимым вновь возвратиться к этому вопросу и попытаться очистить 6-фосфофруктокиназу до такой степени изолирования фермента, когда появляется возможность исследовать катализируемую реакцию в чистом виде. В результате удалось разработать простой способ получения 6-фосфофруктокиназы в виде почти однородного каталитически активного белка.

У убитого обескровленного кролика в холодной комнате отпрепаровывались мышцы спины и задних лапок и тщательно измельчались в мясорубке. Измельченные мышцы экстрагировались сначала равным (30 мин.), затем половинным (15 мин.) объемами охлажденной воды. Оба экстракта после отжатия через полотно соединялись (рН 6,3—6,5), производилось осаждение белков порошком сульфата аммония до 0,3 единицы насыщения. Осадок отделялся фильтрованием через бумагу и отбрасывался. В фильтрате (фракция I) вновь высаливались белки сульфатом аммония до 0,5 единицы насыщения. При этом белковый раствор

имел слабо кислую реакцию (рН 5,8—6,0). Производилось фильтрование через бумагу. Фильтрат отбрасывался, осадок (фракция II) растворялся в воде, реакция среды доводилась 5% аммиаком до рН 8,0—8,2 (по фенолфталеину). Колбочка с белковым раствором погружалась в горячую водяную баню и при энергичном размешивании содержимого при температуре внутри раствора 57° оставлялась там в течение 2—3 мин., после чего быстро извлекалась и охлаждалась. Выпадавший при нагревании хлопьевидный осадок белков отделялся фильтрованием на воронке Бюхнера и отбрасывался. Фильтрат (фракция III) подкислялся 0,5 М уксусной кислотой до рН 5,0—5,2 (по бромкрезолпурпур). При этом выпадал осадок белков, денатурированных на предыдущей стадии. Осадок отбрасывался. Фильтрат (фракция IV) тотчас же нейтрализовался 5% аммиаком до рН 6,8—7,0 (по бромтимолблеу). Далее производилось высаливание белков насыщенным раствором сульфата аммония, доведенным добавлением аммиака до рН 8,3—8,5. К одному объему фильтрата добавлялось 0,8 объема  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , т. е. раствор доводился до 0,44 единицы насыщения. Выпадавший при этом осадок и представлял собой наиболее обогащенную активностью белковую фракцию (фракция V). Наиболее устойчивой при хранении оказалась фракция III.

В основу метода испытания активности 6-фосфофруктокиназы нами было положено определение количества образующегося в ходе реакции фруктозодифосфата с помощью высокоочищенной альдолазы (7) в сочетании с цианидом в качестве «улавливателя» триозофосфатов. Добавляемый в опытную смесь акцептор фосфата (Фр-6Ф) применялся в 3-кратной концентрации по сравнению с той, что давала половинное насыщение фермента (6-фосфофруктокиназы). При этом реакция переноса проходила до конца, т. е. при благоприятных условиях весь лабильный фосфат АТФ (благодаря присутствию миокиназы) переносился на Фр-6Ф. Реакционная смесь состояла из: 0,15 мл Фр-6Ф (3,8  $\mu\text{M}$ ), 0,1 мл АТФ (0,9  $\mu\text{M}$ ), 0,1 мл  $\text{MgSO}_4$  (3  $\mu\text{M}$ ), 0,25 мл раствора фермента и боратного буфера рН 7,3 до 1,2 мл. На первых стадиях очистки добавлялся также флюорид. По окончании реакции (обычно 15 мин. при 37°) в безбелковом трихлоруксусном экстракте альдолазным методом определялось содержание фруктозодифосфата.

Таблица 1

Изолирование 6-фосфофруктокиназы (Образец протокола опыта.  
613 г мышц)

Фракция	Объем в мл	Общ. содерж. белка в мг	Общ. число ед. активн. Р в мг	Удельн. ак- тивн. ед/мг белка-10 <sup>3</sup>	Обогащение ферментом
I . . . . .	1165	28391	127,7	4,4	1
II . . . . .	168	6760	107,5	16,0	3,6
III . . . . .	148	4499	334,5	74,4	16,9
IV . . . . .	143	3367	291,7	86,7	19,6
V . . . . .	35,5	340,8	38,0	111,7	15,3
Фильтрат после фр. V .	229	2876	16,8	6,0	1,3

Фракционирование мышечного экстракта давало на последней стадии обогащение белкового раствора ферментом в 25 раз большее, чем с фракцией I (см. табл. 1). Если же учесть, что белки, выпадающие в интервале 0—0,3 единицы насыщения и отбрасываемые на первой стадии фракционирования, вовсе не содержат активности фосфофруктокиназы и составляют половину всех белков водного экстракта, то истинное обогащение ферментом должно было быть больше в 50 раз.

Возрастание общей активности в 3 раза во фракции III по сравнению с фракцией II (см. табл. 1), повидимому, явилось следствием увеличения количества свободных тио-групп в ферментном белке, обычно наступающего при термической обработке белков. Такое объяснение подтверждается нашими опытами, показавшими, что активность 6-фосфофруктокиназы связана с наличием в белке свободных тио-групп, при блокировании которых активность полностью подавляется.

Для характеристики степени очистки фермента производилось исследование в ультрацентрифуге последней (V) и предпоследней (IV) белковых фракций. Наблюдение велось методом наклонной щели<sup>(8)</sup>.

Как видно из опытных диаграмм седиментации (рис. 1), на последней стадии фракционирования удается достигать почти полной однородности белка. Вместо двух пиков — фосфофруктокиназы (пик *a*) и неизвестного белкового «спутника» (пик *б*) в IV фракции, наблюдается один, почти свободный от «спутника» пик (*a*) в V фракции. Константа седиментации 6-фосфофруктокиназы, вычисленная по данным исследования V фракции,  $S = 6,88 \cdot 10^{-13}$  сек., вычисленная же по пику *a* в IV фракции  $S = 6,08 \cdot 10^{-13}$  сек. На основании величины константы седиментации фермент должен быть отнесен к глобулинам и по молекулярному весу должен приближаться к сывороточному гамма-глобулину. Некоторое расширение у основания седиментационных пиков свидетельствует о том, что белок хотя и достаточно однороден, но частично денатурирован.

Действие фермента имело ясно выраженный оптимум при pH 7,2—7,3. Константа диссоциации фермент-субстратного комплекса, измеренная по Фр-6Ф, найдена равной  $1 \cdot 10^{-3}$  М. «Молярная активность» фермента при 37° и pH 7,3 оказалась необычно малой, около 300 мол. субстрата при расчете на  $10^5$  г белка. Малая каталитическая активность 6-фосфофруктокиназы, повидимому, может являться фактором, ограничивающим скорость «потока» фосфатных групп в ходе реакций гликолиза.

Для дальнейшей характеристики степени изолирования ферментного белка, наряду с физико-химическим исследованием, производился также энзимологический контроль. Ряд тестов показал, что очищенная 6-фосфофруктокиназа, даже в больших концентрациях, не содержит примеси следующих ферментов: аденозинтрифосфатазы, гексокиназы, 1-фосфофруктокиназы, фосфоглюкомутазы, фосфорилазы и ферментов сопряженного окислительного фосфорилирования. Однако даже в препаратах фракции V, почти однородной по седиментационной характеристике, удавалось отчетливо обнаружить активность миокиназы (миозиновым тестом<sup>(8)</sup>) и фосфогексоизомеразы (двумя тестами: изомеризацией Гл-6Ф и Фр-6Ф<sup>(9)</sup>) и по переносу фосфата с АТФ на Гл-6Ф).

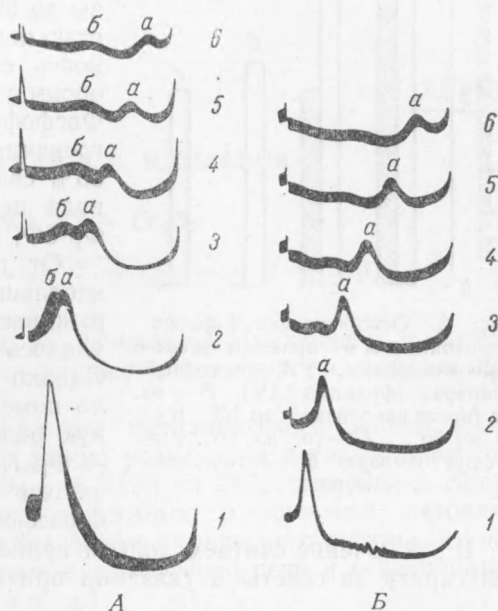


Рис. 1. А—диаграммы седиментации фракции IV. Концентрация белка 1,33%. 1—10 мин., 2—25 мин., 3—50 мин., 4—70 мин., 5—90 мин., 6—105 мин. Б—диаграммы седиментации фракции V. Концентрация белка 1,03%. 1—5 мин., 2—20 мин., 3—40 мин., 4—60 мин., 5—80 мин., 6—100 мин.

Примесь фосфогексоизомеразы лишала нас возможности непосредственно наблюдать взаимодействие АТФ с Фр-6Ф. Поэтому мы задались целью освободиться от нее. Нам удалось полностью достигнуть этого при помощи вторичной термической обработки. Нагревание фракции IV в течение 3 мин. при рН 7,5 уже при 52° давало снижение активности фосфогексоизомеразы до 59% от исходной, а при 58° полностью инактивировало этот фермент: активность его более не обнаруживалась по обоим упомянутым выше тестам (рис. 2). Фосфофруктокиназа же после второго нагревания до 58° сохраняла 73% и до 65° — 63% своей исходной активности и вызывала перенос фосфата с АТФ только на Фр-6Ф, но не на Гл-6Ф.

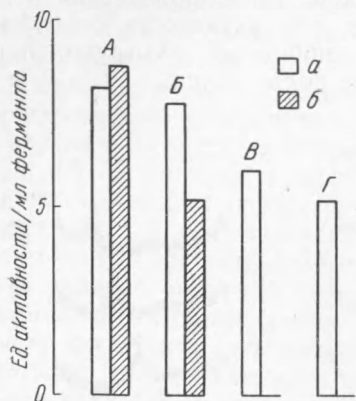


Рис. 2. Освобождение 6-фосфофруктокиназы от примеси фосфогексоизомеразы. А — исходный препарат (фракция IV), Б — то же (после нагревания до 52°, В — то же 58°, Г — то же 65°. а — Р-фруктокиназа, б — Р-гексоизомераза

От примеси миокиназы, повидимому небольшой по количеству белка, не обнаруживаемой в ультрацентрифуге, нам не удалось освободить препарат фермента. Однако присутствие миокиназы не служило помехой к тому, чтобы постулированную ранее (2) реакцию:  $\text{Фр-6Ф} + \text{АТФ} \rightarrow \text{Фр-1, 6Ф} + \text{АДФ}$  наблюдать теперь в чистом виде с помощью изолированной 6-фосфофруктокиназы.

В заключение считаем долгом принести благодарность проф. В. А. Энгельгардту за советы и указания при выполнении этой работы.

Институт экспериментальной медицины  
Академии медицинских наук СССР

Поступило  
24 IV 1953

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> В. А. Энгельгардт, Н. Е. Саков, Биохимия, 8, 9 (1943) <sup>2</sup> P. Ostern, J. Guthke, J. Terszakowes, Z. physiol., Chem., 243, 9 (1936). <sup>3</sup> Н. Е. Саков, Биохимия, 6, 163 (1941). <sup>4</sup> E. Racker, J. Biol. Chem., 167, 843 (1947). <sup>5</sup> J. F. Taylor, Feder. Proc., 6, 297 (1947). <sup>6</sup> I. A. Muntz, ibid., 11, 263 (1952). <sup>7</sup> D. Herbert, H. Gordon, V. Subrahmanyan, D. E. Green, Biochem. J. 34, 1108 (1940). <sup>8</sup> С. Е. Бреслер, П. А. Финогенов, Биохимия, 15, 145 (1950). <sup>9</sup> А. В. Котельникова, ДАН, 69, 837 (1949). <sup>10</sup> С. А. Нейфах, В. И. Гречишкина, Биохимия, 16, 444 (1951).